FICHE TECHNIQUE

IRIS *SALMONELLA*®

DETECTION DES SALMONELLES MOBILES ET IMMOBILES

BM16008	BS07808
BM16108	BS07708
	BT01108

1 DOMAINE D'UTILISATION

IRIS *Salmonella*® constitue une méthode alternative de recherche des salmonelles dans les produits d'alimentation humaine et animale, ainsi que dans les échantillons de l'environnement (à l'exclusion des échantillons de production primaire).

Les analyses peuvent être déclarées négatives dès 37 heures après les étapes d'enrichissement (***Salmonella* Enrichissement**) et de différenciation (**IRIS *Salmonella*® Agar**).

La méthode permet la détection de toutes les salmonelles, mobiles et immobiles.

La confirmation d'éventuels échantillons présomptivement positifs sera réalisée à l'aide d'un test Latex (**CONFIRM' *Salmonella***) ou par les tests classiques décrits dans les méthodes normalisées.

La méthode **IRIS *Salmonella*®** est également validée pour les prises d'essai de 50 g à 375 g pour les poudres de lait (incluant les poudres de lait infantile avec et sans probiotiques) et de 50 g à 125 g pour les farines et les croquettes utilisées dans l'alimentation animale.

IRIS *Salmonella*® est officiellement certifié NF VALIDATION, sous Attestation N° BKR 23/07 - 10/11, dont le terme de validité est fixé au 07 octobre 2015.

BKR 23/07-10/11
METHODES ALTERNATIVES D'ANALYSE POUR L'AGROALIMENTAIRE
Certifié par AFNOR Certification **www.afnor-validation.org**

2 PRINCIPES

- L'étape de dilution au 1/10ème du produit à analyser est réalisée conformément aux recommandations de la norme NF EN ISO 6579 dans le bouillon ***Salmonella* Enrichissement**. La formule de ***Salmonella* Enrichissement** est conforme à celle de l'eau peptonée tamponnée.
- L'étape d'enrichissement est réalisée en ajoutant le **supplément sélectif IRIS *Salmonella*®** au bouillon préalablement mélangé avec l'échantillon à analyser. Le bouillon obtenu, ***Salmonella* Enrichissement,** est alors incubé pendant 18 heures ± 2 heures à 41,5 ± 1,0 °C pour le protocole général 25 g et 18 à 24 heures pour les protocoles 125 g et 375 g.
- L'étape de différenciation est mise en œuvre par ensemencement de 10 µL sur **IRIS *Salmonella*® Agar** et incubation pendant 24 heures ± 3 heures à 37 °C. Les salmonelles donnent des colonies magenta tandis que les colonies des autres espèces sont bleues, violacées ou incolores.
- L'éventuelle étape de confirmation peut être réalisée par les tests classiques décrits dans les méthodes normalisées ou par **CONFIRM' *Salmonella*** *(test au latex*), directement à partir d'une colonie magenta isolée sur **IRIS *Salmonella*® Agar**.

3 FOCUS SUR IRIS *SALMONELLA*® AGAR

Les études réalisées avec **IRIS *Salmonella*® Agar** démontrent sa grande spécificité pour la détection des salmonelles, y compris les espèces et les sérovars atypiques, sources de confusions sur d'autres milieux.

Ainsi, la mise en évidence des *Salmonella* Typhi et Paratyphi, des *Salmonella* lactose-positif (*Salmonella* Senftenberg et sous-espèces S. *arizonae* et S. *diarizonae*), des souches saccharose-positif est assurée.

Le milieu permet la détection des sérovars immobiles (*S.* Pullorum et *S.* Gallinarum) ou des souches monophasiques.

IRIS *Salmonella*® Agar permet également de détecter les souches présentant une activité estérasique faible à nulle sur d'autres milieux (*Salmonella bongori*, *Salmonella* Dublin et Atento, quelques unes des sous-espèces *S. enterica S. houtenae* et *S. diarizonae*).

Les agents sélectifs assurent l'inhibition des bactéries à Gram positif et de certaines bactéries à Gram négatif.
IRIS *Salmonella*® Agar peut également être utilisée dans les méthodes normalisées pour la recherche de *Salmonella*, comme second milieu d'isolement.

4 PREPARATION

Préparation du milieu déshydraté *Salmonella* Enrichissement :

- Mettre en solution 20,0 g de milieu déshydraté (BK194) dans 1 litre d'eau distillée ou déminéralisée.
- Agiter lentement, jusqu'à dissolution complète.
- Répartir en tubes ou en flacons.
- Stériliser à l'autoclave à 121 °C pendant 15 minutes.

✓ **Reconstitution: 20,0 g/L**

✓ **Stérilisation: 15 min à 121°C**

5 MODE D'EMPLOI

Respecter les bonnes pratiques de laboratoire (se référer à la norme NF EN ISO 7218).

Protocole général pour les prises d'essai de 25 g :

Enrichissement

- Introduire aseptiquement (x) g de produit à analyser dans 9 (x) mL de ***Salmonella* Enrichissement** (se référer à la fiche technique BK194, BM136, BM137 et BM144).
- Homogénéiser parfaitement.
- Introduire le **supplément liquide IRIS *Salmonella*®** à raison de 0,1 mL/g d'échantillon (soit 2,5 mL pour 25 g) pour le supplément liquide (BS078).

ou

- Introduire un comprimé de supplément **IRIS *Salmonella*®** (BS077) pour 25 g d'échantillon (dilué au 1/10ème dans ***Salmonella* Enrichissement).**
- Homogénéiser.
- Incuber le bouillon à 41,5 ± 1,0 °C pendant 18 heures ± 2 heures.

✓ **Enrichissement avec supplément**

✓ **Incubation : 18 h à 41,5 °C**

Notes :

- Pour des raisons d'organisation des laboratoires, l'incubation peut être poursuivie jusqu'à 24 heures.
- De la même façon, les bouillons peuvent ensuite être conservés 3 jours à 2-8°C avant repiquage sur **IRIS *Salmonella*® Agar**
- Dans le cadre de la marque NF VALIDATION, les prises d'essai supérieures à 25 g n'ont pas été testées.

Isolement

- Repiquer 10 µL de l'enrichissement obtenu sur **IRIS *Salmonella*® Agar**.
- Incuber à 37 ± 1 °C pendant 24 heures ± 3 heures.

✓ **Repiquage 10 µL**

✓ **Incubation : 24 h à 37 °C**

Note : Pour des raisons d'organisation des laboratoires, les géloses peuvent ensuite être conservées 3 jours à 2-8 °C avant d'être lues et de réaliser les éventuelles confirmations.

Protocole 50 g à 375 g pour les poudres de lait :

Enrichissement

- Introduire aseptiquement (x) g de produit à analyser dans 9 (x) mL de ***Salmonella* Enrichissement** préalablement préchauffé à 41,5 °C ± 1,0 °C.
- Homogénéiser parfaitement.

- Introduire le **supplément liquide IRIS *Salmonella*®** à raison de 0,1 mL/g d'échantillon (soit 37,5 mL pour 375 g d'échantillon) pour le supplément liquide (BS078).

ou

- Introduire un comprimé de supplément **IRIS *Salmonella*®** (BS077) pour 25 g d'échantillon (dilué au 1/10ème dans ***Salmonella* Enrichissement).**

✓ **Enrichissement avec supplément**

✓ **Incubation :**
18 à 24 h à 41,5 °C

- Homogénéiser.
- Incuber le bouillon à 41,5 ± 1,0 °C pendant 18 à 24 heures.

Notes :

- Pour des raisons d'organisation des laboratoires, les bouillons peuvent être conservés 3 jours à 2-8°C avant repiquage sur **IRIS *Salmonella*® Agar**.
- Dans le cadre de la marque NF VALIDATION, seules les prises d'essai comprises entre 50 g et 375 g ont été testées pour les poudres de lait (incluant les poudres de lait infantile avec et sans probiotiques).

Isolement

- Repiquer 10 µL de l'enrichissement obtenu sur **IRIS *Salmonella*® Agar**.
- Incuber à 37 ± 1 °C pendant 24 heures ± 3 heures.

✓ **Repiquage 10 µL**

✓ **Incubation :**
24 h à 37 °C

Note : Pour des raisons d'organisation des laboratoires, les géloses peuvent ensuite être conservées 3 jours à 2-8 °C avant d'être lues et de réaliser les éventuelles confirmations.

Protocole 50 g à 125 g pour les farines ou croquettes dans l'alimentation animale :

Enrichissement

- Introduire aseptiquement (x) g de produit à analyser dans 9 (x) mL de ***Salmonella* Enrichissement** préalablement préchauffé à 41,5°C ± 1,0 °C.
- Homogénéiser parfaitement.
- Introduire le **supplément liquide IRIS *Salmonella*®** à raison de 0,1 mL/g d'échantillon (soit 12,5 mL pour 125 g d'échantillon) pour le supplément liquide (BS078).

ou

- Introduire un comprimé de supplément **IRIS *Salmonella*®** (BS077) pour 25 g d'échantillon (dilué au 1/10ème dans ***Salmonella* Enrichissement).**

✓ **Enrichissement avec supplément**

✓ **Incubation :**
18 à 24 h à 41,5 °C

- Homogénéiser.
- Incuber le bouillon à 41,5 ± 1,0 °C pendant 18 à 24 heures.

Notes :

- Dans le cadre de la marque NF VALIDATION, seules les prises d'essai comprises entre 50 g et 125 g ont été testées pour les farines ou croquettes dans l'alimentation animale.

Isolement

- Repiquer 10 µL de l'enrichissement obtenu sur **IRIS *Salmonella*® Agar**.
- Incuber à 37 ± 1 °C pendant 24 heures ± 3 heures.

✓ **Repiquage 10 µL**

✓ **Incubation :**
24 h à 37 °C

Note : Pour des raisons d'organisation des laboratoires, les géloses peuvent ensuite être conservées 3 jours à 2-8 °C avant d'être lues et de réaliser les éventuelles confirmations.

6 LECTURES

L'aspect des colonies est le suivant :

Microorganismes	Caractéristiques des colonies
Salmonella spp. (y compris *Salmonella* Typhi, Paratyphi, lactose-positif, saccharose-positif, immobile, monophasique, Dublin, *bongori*)	Rosé à Magenta
Escherichia coli	Incolores
Enterobacter spp., *Klebsiella* spp.	Bleu-vert à violet
Proteus spp.	Incolores à brunâtres
Gram positif	Inhibés

Voir ANNEXE 1 : SUPPORT PHOTO.

7 CONFIRMATIONS

Dans le cadre de la marque NF VALIDATION, tous les résultats positifs doivent être confirmés de l'une des manières suivantes :

- Option 1 : Mise en œuvre des tests classiques décrits dans les méthodes normalisées par le CEN ou l'ISO (en incluant l'étape de purification), en repartant d'une colonie magenta isolée sur **IRIS *Salmonella*® Agar.**
- Option 2 : Mise en œuvre de **CONFIRM' *Salmonella*** (test au latex) à partir d'une colonie isolée.

En cas de résultats discordants (positifs par la méthode alternative, non confirmés par l'une des options décrites ci-dessus, et en particulier par le(s) test(s) Latex), le laboratoire devra mettre en œuvre les moyens suffisants pour s'assurer de la validité du résultat rendu. Il est possible par exemple de procéder à des tests biochimiques ou encore d'utiliser des sondes nucléiques tels que décrit dans la norme NF EN ISO 7218.

8 FORMULES-TYPES

Ces formules-types peuvent être ajustées de façon à obtenir des performances optimales.

***Salmonella* Enrichissement** (BK194, BM136, BM137 ou BM144), pour 1 litre de milieu :

- Peptone ..... 10,00 g
- Chlorure de sodium ..... 5,00 g
- Tampon phosphates ..... 5,06 g

IRIS *Salmonella*® Supplément (1 comprimé) :

- Système sélectif ..... 0,1 g
- Colorant ..... 0,005 g

IRIS *Salmonella*® Supplément Liquide (flacon de 50 mL) :

- Système sélectif ..... 2 g
- Colorant ..... 0,1 g

IRIS *Salmonella*® Agar, pour 1040 mL de gélose :

- Peptone ..... 10,0 g
- Extrait de levure ..... 5,0 g
- Chlorure de sodium ..... 5,0 g
- Tampon phosphate ..... 7,0 g
- Agents inhibiteurs ..... 10,2 g
- Mélange chromogène ..... 1,0 g
- Agar agar bactériologique ..... 16,0 g
- Opacifiant ..... 30 mL

pH du milieu prêt-à-l'emploi à 25°C : 7,0 ± 0,2.

9 CONTROLE QUALITE

Aspect du milieu en boîte : gélose blanche, opaque.

Réponse culturale de croissance après 24 heures d'incubation à 37°C (XP CEN ISO/TS 11133) :

Microorganismes		Croissance
Salmonella Typhimurium	WDCM 00031	Bonne, colonies magenta
Salmonella Enteritidis	WDCM 00030	Bonne, colonies magenta
Enterobacter aerogenes	WDCM 00175	Bonne, colonies bleues
Escherichia coli	WDCM 00013	Partiellement inhibée, colonies incolores
Staphylococcus aureus	WDCM 00034	Inhibée
Pseudomonas aeruginosa	WDCM 00025	Inhibée

10 CONSERVATION

Salmonella **Enrichissement :** Milieu déshydraté : 2-30 °C.
Milieu préparé en flacons ou en tubes : Se référer à la norme XP CEN ISO/TS 11133-1.
Milieux prêts-à-l'emploi en flacons ou en poches : 2-25 °C.

Supplément IRIS *Salmonella*® Liquide, Supplément IRIS *Salmonella*® Comprimés : 2-8 °C.

IRIS *Salmonella*® Agar : Milieu pré-coulé en boîtes de Petri (Ø 90 mm) : 2-8 °C.

Kit CONFIRM' *Salmonella* : 2-8 °C.

Les dates de péremption sont mentionnées sur les étiquettes.

11 PRESENTATION

Salmonella **Enrichissement :**
Flacon de 500 g BK194HA
Fût de 5 kg BK194GC
10 flacons de 225 mL BM13608
3 poches souples de 3 litres BM13708
2 poches souples de 5 litres BM14408

IRIS *Salmonella*® Supplément :
10 flacons de 50 mL BS07808
120 comprimés BS07708

IRIS *Salmonella*® Agar :
20 boîtes de Petri (Ø 90 mm) BM16008
120 boîtes de Petri (Ø 90 mm) BM16108

CONFIRM' *Salmonella* :
Kit d'agglutination au Latex BT01108

12 REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

NF EN ISO 6579. Décembre 2002. Microbiologie des aliments - Méthode horizontale pour la Recherche des *Salmonella* spp.. Modifiée en Octobre 2007 par l'amendement A1 : annexe D : recherche de *Salmonella* spp. dans les matières fécales des animaux et dans des échantillons environnementaux au stade de la production primaire.

NF EN ISO 16140. Octobre 2003. Microbiologie des aliments. Protocole pour la validation des méthodes alternatives. Modifiée en Octobre 2011 par l'amendement A1.

NF EN ISO 7218. Octobre 2007. Microbiologie des Aliments. Exigences générales et recommandations. Modifiée en Décembre 2013 par l'amendement A1.

13 AUTRES INFORMATIONS

IRIS *Salmonella*® est une marque déposée de SOLABIA S.A.S.

Les mentions portées sur les étiquettes sont prédominantes sur les formules ou les instructions décrites dans ce document. Elles sont susceptibles d'être modifiées à tout moment, sans préavis.

Code document	:	BM160/FR/2011-02 : 3.
Date création	:	02-2011
Date de révision	:	03-2014
Motif de révision	:	Extension de validation.

IRIS *Salmonella*® Agar

Détection des Salmonelles

Croissance obtenue après 24 heures d'incubation à 37 °C.

***Salmonella* spp.**

Aspect caractéristique
De couleur magenta

***Enterobacter* spp.**

Aspect non caractéristique
De couleur bleue

Rue des Quarante Mines – ZAC de Ther – Allonne – B.P. 10245 – 60002 Beauvais Cedex – France
Tél : + 33 (0)3 44 14 33 33 – Fax : + 33 (0)3 44 14 33 34 – www.biokar-diagnostics.fr